

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07D 277/04, A61K 31/425, C07D 295/18, 417/12</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/61431</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. Dezember 1999 (02.12.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03712</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 28. Mai 1999 (28.05.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 23 831.2 28. Mai 1998 (28.05.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PRO-BIODRUG GESELLSCHAFT FÜR ARZNEIMITTELFORSCHUNG MBH. [DE/DE]; Weinbergweg 22, D-06120 Halle (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Hegelstrasse 14, D-06114 Halle (DE). GLUND, Konrad [DE/DE]; Aralienstrasse 10, D-06122 Halle (DE). SCHLENZIG, Dagmar [DE/DE]; Hegelstrasse 12, D-06114 Halle (DE). KRUBER, Susanne [DE/DE]; Reilstrasse 9, D-06114 Halle (DE).</p> <p>(74) Anwälte: FORSTMAYER, Dietmar, G. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(54) Title: NEW DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV EFFECTORS</p> <p>(54) Bezeichnung: NEUE EFFEKTOREN VON DIPEPTIDYLPEPTIDASE IV</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to dipeptide compounds or compounds analogous to dipeptide compounds, which are made of an amino acid and a thiazolidine or pyrrolidine group, and to their salts. The invention further relates to the use of these compounds in the treatment of impaired glucose tolerance, glucosuria, hyperlipidemia, metabolic acidoses, diabetes mellitus, diabetic neuropathy and nephropathy as well as secondary diseases of diabetes mellitus in mammals.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Dipeptidverbindungen bzw. zu Dipeptidverbindungen analoge Verbindungen, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidiningruppe gebildet werden, und deren Salze, und die Verwendung der Verbindungen zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

NEUE EFFEKTOREN VON DIPEPTIDYLPEPTIDASE IV

Die vorliegende Erfindung betrifft Dipeptidverbindungen bzw. zu Dipeptidverbindungen analoge Verbindungen, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet werden, und deren Salze, im weiteren Dipeptidverbindungen genannt, und die Verwendung der Verbindungen zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

Die Erfindung betrifft also auch ein einfaches Verfahren zur Senkung der Blutzuckerkonzentration von Säugern mit Hilfe von Dipeptidverbindungen als aktivitätsmindernde Effektoren (Substraten, Pseudosubstraten, Inhibitoren, Bindungsproteinen, Antikörpern u. a.) für Enzyme mit vergleichbarer oder identischer Aktivität zur enzymatischen Aktivität des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV.

DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen.

Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide: Gastric Inhibitory Polypeptide 1-2 (GIP₁₋₄₂) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1₇₋₃₆), also Hormone, die die Glukose-induzierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch Incretine genannt), sind Substrate der DP IV, da diese von den

N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin in vitro und in vivo abspalten kann.

Die Reduktion derartiger DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Spaltung solcher Substrate in vivo kann dazu dienen, unerwünschte Enzymaktivität unter Laborbedingungen wie auch bei pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen wirksam zu unterdrücken. Z.B. basiert *Diabetes mellitus* Typ II (auch Altersdiabetes) auf einer verminderten Insulinsekretion bzw. Störungen in der Rezeptorfunktion, die u.a. in proteolytisch bedingten Konzentrationsanomalien der Incretine begründet sind.

Hyperglykämie und damit verbundene Ursachen bzw. Folgeerscheinungen (auch *Diabetes mellitus*) werden nach gegenwärtigem Stand der Technik durch die Verabreichung von Insulin (z.B. von aus Rinderpankreas isoliertem oder auch gentechnisch gewonnenem Material) an erkrankte Organismen in verschiedenen Darreichungsformen behandelt. Alle bisher bekannten, wie auch modernere Verfahren, zeichnen sich durch hohen Materialaufwand, hohe Kosten und oft durch entscheidende Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten aus. Die klassische Methode (tägliche i.v. Insulin-Injektion, üblich seit den dreißiger Jahren) behandelt die akuten Krankheitssymptome, führt aber nach längerer Anwendung u. a. zu schweren Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) und Nervenschädigungen.

Neuerdings wird die Installation subkutaner Depot-Implantate (die Insulinabgabe erfolgt dosiert, und die täglichen Injektionen entfallen) sowie die Implantation (Transplantation) intakter Langerhansscher Zellen in die funktionsgestörte Pan-

kreasdrüse oder andere Organe und Gewebe vorgeschlagen. Derartige Transplantationen sind technisch aufwendig. Weiterhin stellen sie einen risikobehafteten chirurgischen Eingriff in den Empfängerorganismus dar und verlangen auch bei Zellverpflanzungen nach Methoden zur Suppression bzw. der Umgehung des Immunsystems.

Die Verwendung von Alanyl-Pyrrolidid und Isoleucyl-Thiazolidid als Inhibitoren von DP IV bzw. von zu DP IV analoger Enzymaktivität ist bereits aus der PCT/DE 97/00820 und die Verwendung von Isoleucyl-Pyrrolidid und Isoleucyl-Thiazolidid-Hydrochlorid bereits aus der DD 296 075 bekannt. Bei dem in diesem Stand der Technik eingesetzten Isoleucyl-Thiazolidid handelt es sich um natürliches, also L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid: Zum Prioritätsdatum und noch am Anmeldetag der beiden Druckschriften stand nur diese, die natürliche Form von Isoleucyl-Thiazolidid zur Verfügung.

Es ist festgestellt worden, daß diese Verbindungen, insbesondere L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid, gute Effektoren für DP IV und DP IV analoge Enzymaktivitäten sind. Bei der Verwendung dieser Verbindung können bei einigen Patienten bzw. Krankheitsformen jedoch gewisse Probleme auftreten:

Je nach Symptomen und Schwere z.B. von Diabetes mellitus, wäre es z.B. wünschenswert, Effektoren zur Verfügung zu haben, die eine andere Wirkung als die bekannten Verbindungen aufweisen: So ist bekannt, daß Diabetes-mellitus-Patienten individuell "eingestellt" werden müssen, um eine optimale Behandlung ihrer Krankheit zu ermöglichen. So sollte bei einigen Fällen z.B. eine verringerte Aktivität von DP IV Effektoren ausreichen. Auch könnte eine zu hohe Inhibitor Aktivität und die permanen-

te Verabreichung desselben Medikaments insbesondere wegen der lebenslangen Dauer der Behandlung unerwünschte Nebenwirkungen zur Folge haben. Weiter könnte es auch wünschenswert sein, gewisse Transporteigenschaften zur Erhöhung der Resorptionsgeschwindigkeit der Effektoren in vivo zu verbessern.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, neue (insbesondere aktivitätsmindernde) Effektoren zur Behandlung von z.B. beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern und ein einfaches Verfahren zur Behandlung dieser Krankheiten bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Dipeptidverbindungen bzw. Analoga von Dipeptiden, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet werden, und deren Salze gelöst.

Bei der - vorzugsweise oralen - Verabreichung dieser Effektoren an einen Säugerorganismus werden die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulintropen Peptide GIP_{1-42} und GLP-1_{7-36} (o.a. GLP-1_{7-37} , oder deren Analoga) durch DP IV- oder DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert. Der Erfindung liegt also der Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

1. die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität zu relativer Stabilitätserhöhung der Glukose-

stimulierten, oder extern zugeführten Incretine (oder deren Analoga) führt, d.h. durch Applikation von Effektoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Proteine der Incretin-Abbau im Blut kontrolliert werden kann;

2. die erhöhte biologische Abbaustabilität der Incretine (oder ihrer Analoga) eine Wirkungsveränderung endogenen Insulins zur Folge hat;

3. die durch Reduktion der DP IV- bzw. DP IV-analogen enzymatischen Aktivität im Blut erzielte Stabilitätserhöhung der Incretine in einer nachfolgenden Veränderung der Glukose-induzierten Insulinwirkung resultiert und damit zu einer mittels DP IV-Effektoren kontrollierbaren Modulierung des Blut-Glukosespiegels führt.

Insbesondere sind dazu erfindungsgemäß Dipeptidverbindungen geeignet, bei denen die Aminosäure aus einer natürlichen Aminosäure, wie z.B. Leucin, Valin, Glutamin, Prolin, Isoleucin, Asparagin oder Asparaginsäure, ausgewählt wird.

Die möglichst orale Applikation der erfindungsgemäßen hochaffinen, niedermolekularen Enzyminhibitoren ist eine kostengünstigere Alternative z.B. zu invasiven chirurgischen Techniken bei der Behandlung pathologischer Erscheinungen. Durch chemisches Design von Stabilitäts-, Transport- und Clearance-Eigenschaften kann deren Wirkungsweise modifiziert und auf individuelle Eigenschaften abgestimmt werden.

Wie vorstehend erwähnt, kann es z.B. bei der Dauerbehandlung von Diabetes mellitus erforderlich sein, Effektoren mit einer definierten Aktivität zur Verfügung zu stellen, mit denen in-

dividuelle Bedürfnisse von Patienten erfüllt bzw. Symptome behandelt werden können. Die erfindungsgemäßen Dipeptidverbindungen weisen daher bei einer Konzentration (der Dipeptidverbindungen) von 10 μ M, insbesondere bei den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen, eine Aktivitätsminderung von Dipeptidyl Peptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten von mindestens 10, bevorzugt von mindestens 40 % auf. Häufig ist auch eine Aktivitätsminderung von mindestens 60 % bzw. mindestens 70 % erforderlich. Bevorzugte Effektoren können auch eine Aktivitätsminderung von maximal 20 % bzw. 30 % aufweisen. Weiterhin sind die Transporteigenschaften der vorliegenden Verbindungen, insbesondere durch den Peptidtransporter Pep T1 deutlich verbessert.

Besonders bevorzugte Dipeptidverbindungen sind L-allo-Isoleucyl-Thiazolidid und seine Salze. Diese Verbindungen weisen im Verhältnis zu L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid bei in etwa gleichgroßer Wirkung bezüglich der Glukosemodulation überraschenderweise einen ca. fünffach besseren Transport durch den Peptidtransporter Pep T1 auf.

Weitere bevorzugte Verbindungen werden in Tabelle 1 angegeben.

Die Salze der erfindungsgemäßen Dipeptidverbindungen können z.B. organische Salze wie Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate sein. Besonders bevorzugt werden die Fumarate, die eine hervorragende Wirkung bei einer überraschend hohen Stabilität gegenüber Hydrolyse aufweisen und wesentlich weniger löslich sind als die Hydrochloride. Diese Eigenschaften sind auch bei der Galenik von Vorteil.

Ferner werden L-threo Isoleucyl Pyrrolidid und seine Salze, insbesondere die Fumarsalze, und L-allo Isoleucyl Pyrrolidid und seine Salze, insbesondere die Fumarsalze, bevorzugt.

Die Salze der Dipeptidverbindungen können in einem molaren Verhältnis von Dipeptid(analogon)komponente zu Salzkomponente von 1 : 1 oder 2 : 1 vorliegen. Ein derartiges Salz ist z.B. (Ile-Thia), Fumarsäure.

Besonders bevorzugte Salze sind die Fumarsalze von L-threo-Isoleucyl Thiazolidid und L-allo-Isoleucyl Thiazolidid.

Die Erfindung betrifft somit Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität und deren Verwendung zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität zur Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen wie z.B. beeinträchtigte Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einem Säuger-Organismus eine therapeutisch wirksame Menge mindestens eines erfindungsgemäßen Effektors der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität verabreicht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, also Medikamente, die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung oder deren Salze gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Lösungsmitteln enthalten.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können z.B. als parenterale oder enterale Formulierungen vorliegen und entsprechende Träger enthalten bzw. sie können als orale Formulierungen vorliegen, die entsprechende zur oralen Verabreichung geeignete Träger enthalten können. Vorzugsweise liegen sie als orale Formulierungen vor.

Zusätzlich können die pharmazeutischen Zusammensetzungen einen oder mehrere hypoglykämisch wirkende Wirkstoffe enthalten, die an sich bekannte Wirkstoffe sein können.

Die erfindungsgemäßen Effektoren der DP IV bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität können zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus bzw. zur Herstellung eines entsprechenden Medikaments verwendet werden.

Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungen oder Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV- bzw. DP IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Erfindungsgemäße Effektoren

sind z.B. DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptidderivate bzw. Dipeptidmimetika L-allo-Isoleucyl-Thiazolidid und die in Tabelle 1 angegebenen Effektoren und deren Fumarsalze. Die erfindungsgemäßen Effektoren ermöglichen eine individuell einstellbare Behandlung von Patienten bzw. Krankheiten, wobei insbesondere individuell auftretende Unverträglichkeiten, Allergien und Nebenwirkungen vermieden werden können.

Auch weisen die Verbindungen unterschiedliche zeitliche Verläufe der Wirksamkeit auf. Dadurch wird dem behandelnden Arzt die Möglichkeit in die Hand gegeben, differenziert auf die individuelle Situation eines Patienten zu reagieren: Einerseits kann er die Geschwindigkeit des Eintritts der Wirkung und andererseits die Dauer der Wirkung und insbesondere die Stärke der Wirkung genau einstellen.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, bei Säugern und insbesondere in der Humanmedizin geeignet.

Die Effektoren werden z.B. in Form von pharmazeutischen Präparaten verabreicht, die den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien enthalten. Beispielsweise werden sie parenteral (z.B. i.v., in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z.B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit müssen pro Tag einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Z.B. kann ein solcher Dosisbereich beim Menschen im Bereich von 0.01 mg bis 30.0 mg pro Tag, vorzugsweise im Bereich von 0.01 bis 10 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm Körpergewicht liegen.

Es wurde gefunden, daß durch Verabreichung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten im Blut eines Säugers, durch deren damit verbundene, temporäre Aktivitätsreduktion, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP_{1-42}) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1_{7-36}) (o.a. GLP-1_{7-37} oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert werden. Die durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielte, erhöhte Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert u.a. die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlenhydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht.

Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie beeinträchtigte Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen und Diabetes mellitus, Krankheitsbilder die Folge einer über einen längeren

Zeitraum erhöhten Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden.

In der Reihe der aus dem Stand der Technik bekannten, oral wirksamen Antidiabetika ist bisher eine derartig wirksame, niedermolekulare Substanzklasse (mit Ausnahme des Biguanides Metformin: Molekulargewicht 130) nicht bekannt. Die Molekulargewichte der Aminoacyl Thiazolidide bewegen sich zwischen 146 (Glycyl Thiazolidid), 203 (Isoleucyl Thiazolidid) und 275 (Tryptophanoyl Thiazolidid). Im Vergleich bewegen sich die Molekulargewichte der Sulphonylharnstoffe (Glibenclamid: 494), der Saccharide (Acarbose: 630) sowie der Thiazolidindione (Pioglitazon: 586) im Bereich um 500 bis 700 Da. Physiologisch werden Aminoacyl Thiazolidide durch Aminopeptidasen sowie durch saure Hydrolyse in körpereigene Substanzen, wie Aminosäuren und Cysteamin, hydrolysiert, so daß die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen als oral verfügbare Antidiabetika eine Bereicherung der Pharmazie darstellt.

Bei Ratten und Mäusen ist experimentell induzierte Hyperglykämie durch orale Verabreichung mit den erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen überdurchschnittlich gut behandelbar (Tabellen 2 und 3). Die Verabreichung des 500- bis 1000-fachen der wirksamen Dosis führte zu keiner nachweisbaren pathologischen Veränderung während drei-wöchiger toxikologischer Experimente an Ratten und Mäusen.

Die vorteilhafte Wirkung von erfindungsgemäßen Verbindungen auf DP IV ist in Tabelle 1 beispielhaft belegt:

Tabelle 1: Wirkung verschiedener Effektoren auf die durch Di-peptidyl Peptidase IV katalysierte Hydrolyse von 0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH 7,6 und einer Ionenstärke von 0,125.

Effektor	Effektoraffinität zu DP IV: K_i [nM]	% Restaktivität der DP IV in Gegenwart von 10 μ M Effektor
Metformin	» 1.000.000	100
Glibenclamid	» 1.000.000	100
Acarbose	» 1.000.000	100
H-Asn-Pyrrolidid	12.000	83,1
H-Asn-Thiazolidid	3.500	47,2
H-Asp-Pyrrolidid	14.000	81,6
H-Asp-Thiazolidid	2.900	45,6
H-Asp(NHOH)-Pyrrolidid	13.000	88,2
H-Asp(NHOH)-Thiazolidid	8.800	54,5
H-Glu-Pyrrolidid	2.200	38,5
H-Glu-Thiazolidid	610	25,0
H-Glu(NHOH)-Pyrrolidid	2.800	44,9
H-Glu(NHOH)-Thiazolidid	1.700	36,5
H-His-Pyrrolidid	3.500	49,7
H-His-Thiazolidid	1.800	35,2
H-Pro-Pyrrolidid	4.100	50,2
H-Pro-Thiazolidid	1.200	27,2
H-Ile-Azididid	3.100	43,8
H-Ile-Pyrrolidid	210	12,3
H-L-allo-Ile-Thiazolidid	190	10,0
H-Val-Pyrrolidid	480	23,3
H-Val-Thiazolidid	270	13,6

Es ist bekannt, daß Aminoacyl Pyrrolidide und Aminoacyl Thiazolidide durch die in den Mucosazellen des Dünndarms, im Serum und in Leberzellen vorhandenen Enzyme Prolin Aminopeptidase und Prolidase abgebaut werden können und der Thiazolidinring zur Öffnung in Gegenwart von Säuren (beispielsweise im Magen) unter Bildung des adäquaten Cysteamin-Derivates neigt [vgl. US 458407]. Es war daher überraschend, eine dosisabhängige Wirksamkeit der Wirkstoffe nach per oraler Verabreichung zu finden. Die Dosisabhängigkeit der Wirkung von L-allo-Ile-Thiazolidid auf die Serum-DP IV Aktivität nach oraler Applikation von L-allo-Isoleucyl Thiazolidid an gesunden Wistarratten ist mit folgender Tabelle belegt:

Tabelle 2: Restaktivität der DP IV im Serum gegenüber 0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH 7,6 und einer Ionenstärke von 0,125, nach oraler Gabe und in Abhängigkeit von der Dosis L-allo-Isoleucyl Thiazolidid, bestimmt 30 min nach Applikation des Inhibitors.

Dosis pro Versuchstier	Restaktivität der DP IV in %
0 mg	100
2,5 mg	52
5,0 mg	40
10 mg	28
20 mg	29

Ausgesprochen überraschend und wünschenswert ist die im diabetischen Tiermodell erzielte Glukose-reduzierende Wirkung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs L-allo-Isoleucyl Thiazolidid nach

seiner oralen Verabreichung bei zeitgleicher oraler Glukose-Stimulierung (Tabelle 3).

Zur Verstärkung der blutzuckersenkenden Wirkung verschiedener Antidiabetika werden häufig Kombinationen verschiedener oral wirksamer Antidiabetika eingesetzt. Da sich die antihyperglykämische Wirkung der erfindungsgemäßen Effektoren unabhängig von anderen bekannten oral applizierbaren Antidiabetika entfaltet, eignen sich die erfindungsgemäßen Wirkstoffe analog in entsprechender galenischer Form, zur Erzielung des gewünschten normoglykämischen Effektes, zum Einsatz bei Kombinationstherapien.

Somit können die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen in an sich bekannter Weise in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie z. B. Tabletten, Kapseln, Dragees, Pillen, Suppositorien, Granulate, Aerosole, Sirupe, flüssige, feste und cremeartige Emulsionen und Suspensionen und Lösungen unter Verwendung inerter, untoxischer, pharmazeutisch geeigneter Träger- und Zusatzstoffe oder Lösungsmittel. Hierbei liegen die therapeutisch wirksamen Verbindungen jeweils vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0.1 bis 80, vorzugsweise von 1 bis 50 Masseprozent der Gesamtmischung vor, d.h. in Mengen, die ausreichend sind, um den angegebenen Dosierungsspielraum zu erreichen.

Tabelle 3: Reduktion der zirkulierenden Blutglukose innerhalb 60 min nach oraler Verabreichung von 20 μ M L-allo-Ile-Thiazolidid an Ratten verschiedener Tiermodelle bei zeitgleichem Glukosetoleranztest (Angaben in % bezogen auf normoglykämische Werte).

Tiermodell	Glukosekonzentration in % Kontrolle	Glukosekonzentration in % L- allo-Ile-Thiazolidid behandelt
Wistarratte, normal	100	82
Wistarratte (Diabetes 2b - Model, dick)	100	73

Die gute Resorption der erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen durch Schleimhäute des gastrointestinalen Traktes ermöglicht die Anwendung von vielen galenischen Zubereitungen:

Die Substanzen können als Medikament in Form von Dragees, Kapseln, Beißkapseln, Tabletten, Tropfen, Sirup, aber auch als Zäpfchen oder als Nasensprays angewendet werden.

Die Formulierungen werden beispielsweise hergestellt durch Strecken des Wirkstoffs mit Lösungsmitteln und/oder Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von Emulgatoren und/oder Dispergiermitteln, wobei z. B. im Fall des Einsatzes von Wasser als Verdünnungsmittel gegebenenfalls organische Lösungsmittel als Hilfslösungsmittel verwendet werden können.

Als Hilfsstoffe seien beispielhaft aufgeführt: Wasser, un-toxische organische Lösungsmittel, wie Paraffine (z. B. Erdölfraktionen), pflanzliche Öle (z. B. Rapsöl, Erdnußöl, Sesamöl), Alkohole (z.B. Ethylalkohol, Glycerin), Glykole (z.B. Propylenglykol, Polyethylenglykol); feste Trägerstoffe, wie z. B. natürliche Gesteinsmehle (z. B. hochdisperse Kieselsäure, Silikate), Zucker (z.B. Roh-, Milch- und Traubenzucker); Emulgiermittel, wie nichtionogene und anionische Emulgatoren (z.

B. Polyoxyethylen-Fettsäure-Ester, Polyoxyethylen-Fettalkohol-Ether, Alkylsulfonate und Arylsulfonate), Dispergiermittel (z.B. Lignin, Sulfitablaugen, Methylcellulose, Stärke und Polyvinylpyrrolidon) und Gleitmittel (z.B. Magnesiumstearat, Talkum, Stearinsäure und Natriumlaurylsulfat) und gegebenenfalls Aromastoffe.

Die Applikation erfolgt in üblicher Weise, vorzugsweise enteral oder parenteral, insbesondere oral. Im Falle der enteralen Anwendung können Tabletten außer den genannten Trägerstoffen weitere Zusätze wie Natriumcitrat, Calciumcarbonat und Calciumphosphat, zusammen mit verschiedenen Zuschlagsstoffen, wie Stärke, vorzugsweise Kartoffelstärke, Gelatine und dergleichen enthalten. Weiterhin können Gleitmittel, wie Magnesiumstearat, Natriumlaurylsulfat und Talkum zum Tablettieren mitverwendet werden. Im Falle wäßriger Suspensionen und/oder Elixieren, die für orale Anwendungen gedacht sind, können die Wirkstoffe außer mit den oben genannten Hilfsstoffen zusätzlich mit verschiedenen Geschmacksaufbesserern oder Farbstoffen versetzt werden.

Bei einer parenteralen Anwendung können Lösungen der Wirkstoffe unter Verwendung geeigneter flüssiger Trägermaterialien eingesetzt werden. Im allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, bei intravenöser Applikation Mengen von etwa 0,01 bis 2,0 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 1,0 mg/kg Körpergewicht pro Tag zur Erreichung wirksamer Ergebnisse zu verabreichen, und bei enteraler Applikation beträgt die Dosierung etwa 0,01 bis 2 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag.

Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit vom Körpergewicht des Versuchstieres oder Patienten bzw. der Art des Applikationsweges, aber auch aufgrund der Tierart und deren individuellem Verhalten gegenüber dem Medikament bzw. Intervall, zu welchem die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muß. Im Fall der Applikation größer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehrere Einzelgaben über den Tag zu verteilen. Für die Applikation in der Humanmedizin ist der gleiche Dosierungsspielraum vorgesehen. Sinngemäß gelten hierbei auch die obigen Ausführungen.

Beispiele für pharmazeutische Formulierungen

1. Kapseln mit 100 mg L-allo-Isoleucyl Thiazolidid pro Kapsel:

Für ca. 10 000 Kapseln wird eine Lösung folgender Zusammensetzung hergestellt:

L-allo-Isoleucyl Thiazolidid Hydrochlorid	1,0 kg
Glycerin	0,5 kg
Polyethylenglykol	3,0 kg
Wasser	<u>0,5 kg</u>
	5,0 kg

Die Lösung wird nach an sich bekannter Weise in Weichgelatine-kapseln abgefüllt. Die Kapseln sind zum Zerbeißen oder zum Schlucken geeignet.

2. Tabletten bzw. lackierte Tabletten oder Dragees mit 100 mg L-allo-Isoleucyl Thiazolidid:

Die folgenden Mengen beziehen sich auf Herstellung von 100 000 Tabletten:

L-allo-Isoleucyl Thiazolidid Hydrochlorid,	
fein vermahlen	10,0 kg
Glukose	4,35 kg
Milchzucker	4,35 kg
Stärke	4,50 kg
Zellulose, fein vermahlen	4,50 kg

Obige Bestandteile werden gemischt und anschließend mit einer Lösung, hergestellt aus

Polyvinylpyrrolidon	2,0 kg
Polysorbat	0,1 kg
und Wasser	ca. 5,0 kg

versehen und in an sich bekannter Weise granuliert, indem die feuchte Masse geraspelt und nach Zugabe von 0,2 kg Magnesiumstearat getrocknet wird. Die fertige Tablettenmischung von 30,0 kg wird zu gewölbten Tabletten von 300 mg Gewicht verarbeitet. Die Tabletten können nach an sich bekannter Weise lackiert oder dragiert werden.

Die technischen Daten bevorzugter Verbindungen werden nachstehend angegeben.

Untersuchungen zu Ile-Thia*Fumarat (Isomere) und anderen Salzen

Substanz	K _i	Fp (°C)	CE (min)	MS	[α] _{H₂O}
L-threo-IT*F	8*10 ⁻⁸	150 ^{bSC}	160	203	-10,7 (405nm)
D-threo-IT*F	keine Hemmung	147	158	203	nicht bestimmt
L-allo-IT*F	2*10 ⁻⁷	145-6	154	203	-4,58 (380nm)
D-allo-IT*F	keine Hemmung	144-6	150	203	4,5 (380nm)

IT*F = Isoleucyl-Thiazolidid Fumarat

Die NMR und HPLC Daten bestätigen, daß es sich um die entsprechenden Substanzen handelte

Meßbedingungen für die K_i-Bestimmung der Substanzen

Enzym: DPIV_{Schweineiere}, 0,75mg/ml, 18U/ml (GPpNA)
in 25mM Tris pH 7,6, 30% Ammoniumsulfat, 0,5mM EDTA, 0,5mM DTE
Stammlösung: 1:250 verdünnt in Meßpuffer

Puffer: 40mM HEPES pH 7,6, I=0,125 (KCl)

Substrat: GPpNA*HCl
Stammlösung: 2,1mM

Meßgerät: Perkin-Elmer Bio Assay Reader, HTS 7000 Plus,
T=30°C
λ= 405nm

Meßansatz: 100µl Puffer
100µl Substrat (3 verschiedene Konzentrationen 0,8mM – 0,2mM)
50µl Wasser/Inhibitor (7 verschiedene Konzentrationen 2,1µM – 32,8nM)
10µl Enzym

Puffer, Wasser/Inhibitor und Enzym wurden auf 30°C vortemperiert und die Reaktion durch die Zugabe von ebenfalls vortemperiertem Substrat gestartet.

Es wurden 4fach Bestimmungen durchgeführt.

Die Meßzeit betrug 10min.

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden an einem Kofler-Heiztischmikroskop der Leica-Aktiengesellschaft, die Werte sind nicht korrigiert, oder an einem DSC-Gerät (bei Heumann-Pharma) bestimmt.

Optische Rotation

Die Drehwerte wurden bei unterschiedlichen Wellenlängen an einem „Polarimeter 341“ oder höher der Fa. Perkin Elmer aufgenommen.

Meßbedingungen für die Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden an einem „API 165“ bzw. „API 365“ der Fa. PE Sciex mittels Elektrosprayionisation (ESI) aufgenommen.

Es wird mit einer ungefähren Konzentration von $c = 10 \mu\text{g/ml}$ gearbeitet, die Substanz wird in MeOH / H₂O 50:50, 0,1 % HCO₂H aufgenommen, die Infusion erfolgt mit Spritzenpumpe (20 $\mu\text{l/min}$). Die Messungen erfolgten im Positivmodus $[\text{M}+\text{H}]^+$, die ESI-Spannung beträgt $U = 5600\text{V}$.

Die Salze weisen die folgenden Daten auf:

IT*Salz	K _i	M (g mol ⁻¹)	Fp (°C)
Succinat	5,1 e-8	522,73	116
Tartrat	8,3 e-8	352,41	122
Fumarat	8,3 e-8	520,71	156
Hydrochlorid	7,2 e-8	238,77	169
Phosphat	1,3 e-7	300,32	105

Löslichkeitsuntersuchung der Salze des Ile-Thia

Ile-Thia*Fum

Einwaage 10,55 mg

entspricht 0,02 mmol (520,72 g/mol)

Zugabe von 100 μl H₂O_{dest}

100 μl keine Lösung, optisch: keine Oberflächenbenetzung

ab 200 µl sukzessiver Beginn der Löslichkeit
bei 400 µl ist eine vollständiges Lösen zu beobachten
2,63 %

Bei diesem Salz wurde also festgestellt, daß es kaum benetzbar ist und sich nicht zersetzt.

Ile-Thia*Succ

Einwaage 16,6 mg
entspricht 0,031 mmol (522,73 g/mol)
Zugabe von 16 µl H₂O_{dest}
16 µl keine Lösung, optisch „Aufsaugen“ der Feuchtigkeit
von 66 µl – 1,5 ml kein vollständiges Lösen der Substanz zu beobachten

Ile-Thia*Tartrat

Einwaage 17,3 mg
entspricht 0,049 mmol (352,41 g/mol)
Zugabe von 100 µl H₂O_{dest}
100 µl vollständiges Lösen
17,3 %

Ile-Thia*Phos

Einwaage 15,5 mg
entspricht 0,051 mmol (300,32 g/mol)
Zugabe von 100 µl H₂O_{dest}
100 µl Anlösen ist zu beobachten
sukzessive Zugabe von 100 µl H₂O
bei 400 µl vollständiges Lösen
3,87 %

Ile-Thia*HCl

Einwaage 16,1 mg
entspricht 0,067 mmol (238,77 g/mol)
Zugabe von 100 µl H₂O_{dest}
bei 100 µl vollständiges Lösen
16,1 %

Allgemeine Synthese Ile-Thia*Salz

Die Boc-geschützte Aminosäure Boc-Ile-OH wird in Essigsäureethylester vorgelegt, der Ansatz wird auf ca. -5°C gekühlt. N-Methylmorpholin wird zugetropft, Pivalinsäurechlorid (Labor) bzw. Neohexanoylchlorid (Technikum) wird unter Temperaturkonstanz zugetropft. Die Reaktion wird für wenige Minuten zur Aktivierung gerührt. N-Methylmorpholin (Labor) und Thiazolidinhydrochlorid (Labor) werden nacheinander zugetropft, Thiazolidin (Technikum) wird zugegeben. Die Aufarbeitung im Labor erfolgt klassisch mit Salzlösungen, im Technikum wird der Ansatz mit NaOH- und CH_3COOH -Lösungen gereinigt. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wird durch HCl / Dioxan (Labor) bzw. H_2SO_4 (Technikum) erzielt.

Im Labor wird das Hydrochlorid aus EtOH / Ether kristallisiert.

Im Technikum wird das freie Amin durch Zugabe von NaOH / NH_3 dargestellt. Fumarsäure wird in heißen Ethanol gelöst, das freie Amin wird zugetropft, es fällt (Ile-Thia)₂-Fumarat ($M = 520,71 \text{ g mol}^{-1}$).

Die Analytik von Isomeren bzw. Enantiomeren erfolgt durch Elektrophorese.

Patentansprüche

1. Dipeptidverbindung, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet wird, und deren Salze.
2. Dipeptidverbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure aus einer natürlichen Aminosäure ausgewählt wird.
3. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie bei einer Konzentration von 10 μM eine Aktivitätsminderung von Dipeptidylpeptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten von mindestens 10 % bewirkt.
4. Dipeptidverbindung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aktivitätsminderung von mindestens 40 % bewirkt.
5. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure aus Leucin, Valin, Glutamin, Prolin, Isoleucin, Asparagin und Asparaginsäure ausgewählt wird.
6. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, nämlich L-threo-Isoleucyl Pyrrolidid, L-allo-Isoleucyl Thiazolidid, l-allo-Isoleucyl Pyrrolidid und deren Salze.
7. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Salze organische Salze wie

Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate sind.

8. Salze von Dipeptidverbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einem molaren Verhältnis von Dipeptidverbindung zu Salz von 1 : 1 oder 2 : 1 vorliegen.
9. Salze von Dipeptidverbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, nämlich Fumarsalze.
10. Salze von Dipeptidverbindungen nach Anspruch 9, nämlich Fumarsalze von L-threo-Isoleucyl Thiazolidid oder Fumarsalze von L-allo-Isoleucyl Thiazolidid.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Verbindung oder deren Salze nach einem der vorstehenden Ansprüche gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Lösungsmitteln enthält.
12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Träger für parenterale oder enterale Formulierungen handelt.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer Formulierung zur oralen Verabreichung vorliegt.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich einen hypoglykämisch wirkenden Wirkstoff enthält.

15. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Herstellung eines Medikaments zur Aktivitätsminderung von Dipeptidylpeptidase IV bzw. von Dipeptidylpeptidase IV analogen Enzymaktivitäten.
16. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikaments zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säugers.
17. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikaments zur oralen Behandlung von mit Diabetes mellitus im Zusammenhang stehenden Stoffwechselerkrankungen.
18. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

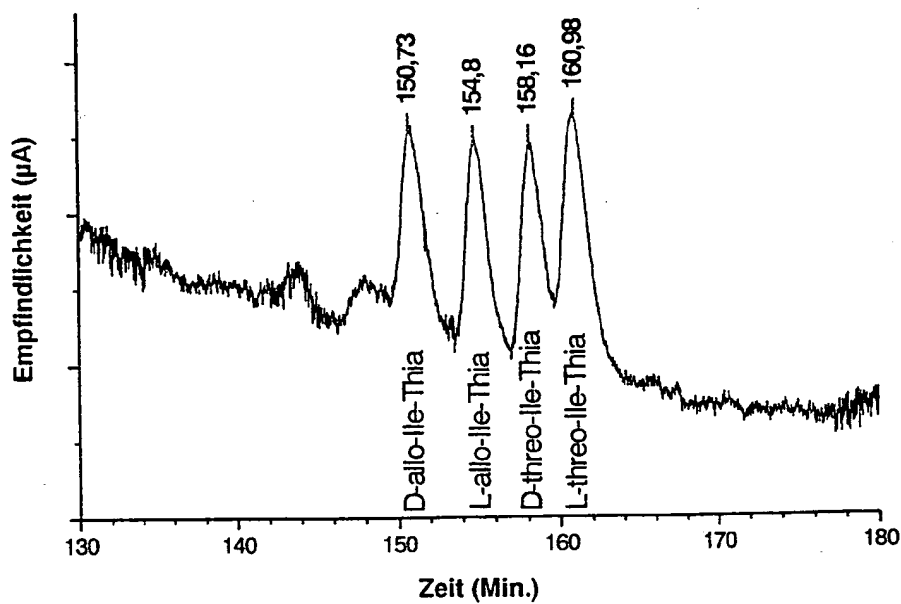
Kapillarzonenelktrophorese (CE) -Trennung der Isomere des Isoleucyl Thiazolidids

Abb. 1: CE-Trennung von einer 1:1:1:1 – Mischung von L-threo-Ile-Thia*Fum, L-allo-Ile-Thia*Fum, D-threo-Ile-Thia*Fum, D-allo-Ile-Thia*Fum

Methode und Meßbedingungen:

CE-Untersuchungen erfolgten am „P/ACE™ System MDQ“ der Firma Beckman:

Substanz	CE (min)
L-threo-IT*F	160
D-threo-IT*F	158
L-allo-IT*F	154
D-allo-IT*F	150

Laufbedingungen:

Puffer: 20 mM Phosphat, pH 7,0, 100 mM β -Hydroxy-propyl-cyclodextrin
 Kapillare: 50 / 60,2 cm, 25 μ m Innendurchmesser, beschichtet mit Acrylamid
 Spannung: 10 kV
 Detektion: Photo-Dioden-Array-Detektor bei 214 nm
 Temperatur: 7°C

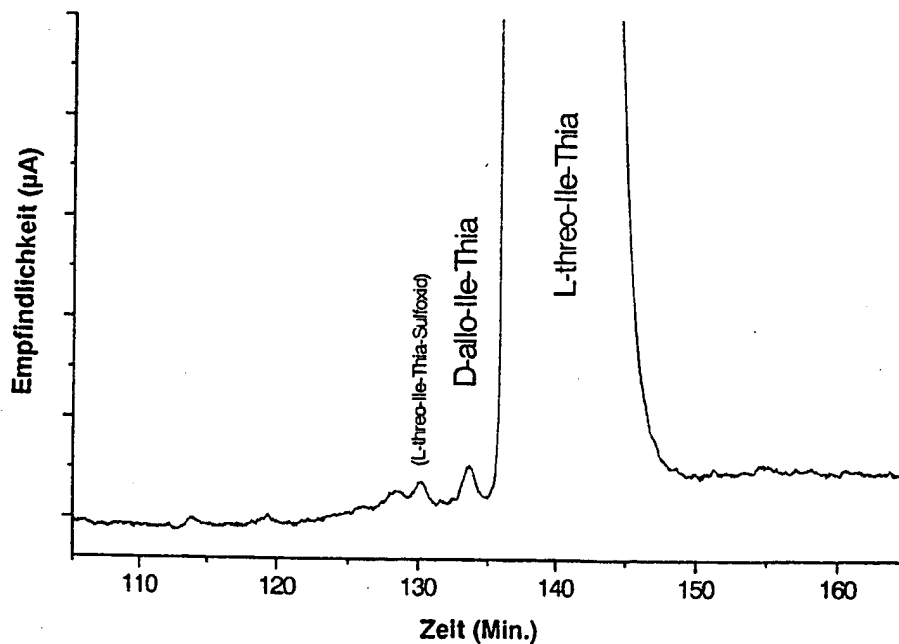
CE-Trennung von Ile-Thia*Fumarat

Abb. 2: CE-Trennung von einer 1:1000 Mischung L-threo-Ile-Thia*Fumarat zu D-allo-Ile-Thia*Fumarat

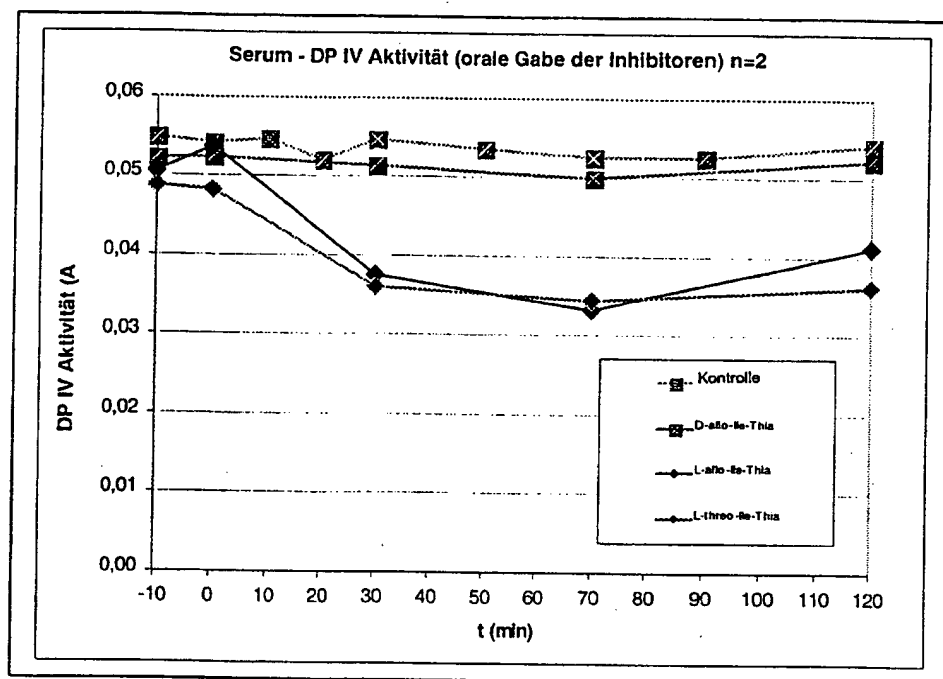
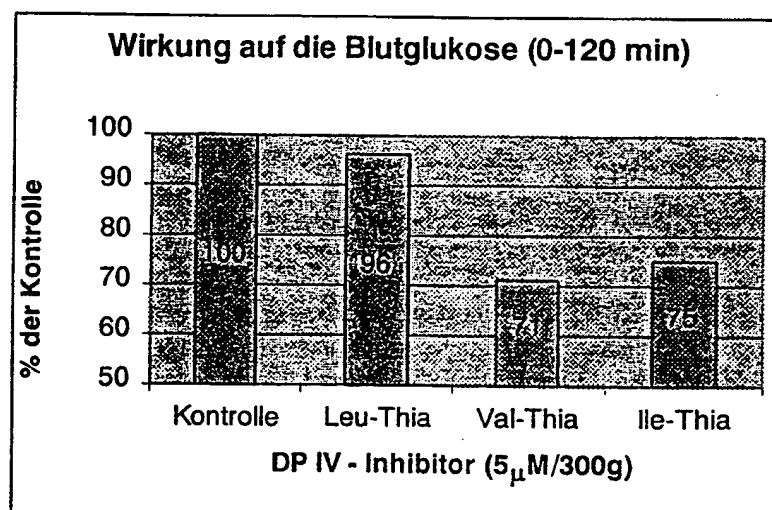


Abb. 3: Serum DP IV-Aktivität nach oraler Applikation verschiedener H-Ile-Thia Stereoisomere ($5 \mu\text{M}/300 \text{ g}$ Ratte). Beeinflussung der Enzymaktivität erfolgt nur durch L-allo-Ile-Thia und L-threo-Ile-Thia.

Abb. 4: Wirkung verschiedener Aminoacyl-Thiazolidide auf die Glukosetoleranz der Ratte (Oraler Glukosetoleranztest mit $2\text{g}/300\text{g}$ Wistar ratte zum Zeitpunkt 0, Gabe der DP IV-Inhibitoren 10 min vor oraler Glukosestimulierung)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/03712

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07D277/04 A61K31/425 C07D295/18 C07D417/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 40832 A (HANS KNÖLL INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG) 6 November 1997 (1997-11-06) cited in the application claims; examples 2,3 ---	1-18
X	WO 95 15309 A (FERRING BV) 8 June 1995 (1995-06-08) claims --- -/--	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 September 1999

Date of mailing of the international search report

17/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Henry, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/03712

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 15, 14 October 1991 (1991-10-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 149947q, SCHOEN EKKEHARD ET AL: "Dipeptidyl peptidase IV in the immune system. Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes" page 37; XP002114197 abstract & BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, vol. 372, no. 5, 1991, pages 305-311, ---	1-18
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER-UNIV. HALLE), 21 November 1991 (1991-11-21) cited in the application abstract ---	1-18
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 2, 13 January 1997 (1997-01-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 16161j, STOECKEL A. ET AL: "Competitive inhibition of proline specific enzymes by amino acid thioxopyrrolidides and thiazolidides" page 241; XP002114198 abstract & PEPT: CHEM., STRUCT. BIOL., PROC. AM. PEPT. SYMP., no. 14, 1995, pages 709-710, ---	1-18
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 25, 21 June 1993 (1993-06-21) Columbus, Ohio, US; abstract no. 255342k, page 933; XP002114199 abstract & JP 04 334357 A (FUJERE BIO INC) 20 November 1992 (1992-11-20) ---	1-18

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/03712

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HEIHACHIRO ET AL: "Synthesis of prolyl endopeptidase inhibitors and evaluation of their structure-activity relationships : in vitro inhibition of prolyl endopeptidase"</p> <p>CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., vol. 41, no. 9, 1993, pages 1583-1588, XP002114196</p> <p>PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP</p> <p>ISSN: 0009-2363</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/03712

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9740832	A	06-11-1997	DE 19616486 A	30-10-1997
			AU 3023397 A	19-11-1997
			CN 1216468 A	12-05-1999
			EP 0896538 A	17-02-1999
WO 9515309	A	08-06-1995	AU 1113395 A	19-06-1995
			AU 8421998 A	12-11-1998
			CA 2178066 A	08-06-1995
			CN 1141033 A	22-01-1997
			CZ 9601595 A	15-01-1997
			EP 0731789 A	18-09-1996
			FI 962315 A	05-08-1996
			HU 76274 A	28-07-1997
			JP 9509921 T	07-10-1997
			NO 962269 A	30-07-1996
			PL 314838 A	30-09-1996
			ZA 9409525 A	02-08-1995
DD 296075	A	21-11-1991	NONE	
JP 4334357	A	20-11-1992	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07D277/04 A61K31/425 C07D295/18 C07D417/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07D A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 40832 A (HANS KNÖLL INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG) 6. November 1997 (1997-11-06) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche; Beispiele 2,3 ---	1-18
X	WO 95 15309 A (FERRING BV) 8. Juni 1995 (1995-06-08) Ansprüche --- -/--	1-18

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. September 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17/09/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Henry, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 15, 14. Oktober 1991 (1991-10-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 149947q, SCHOEN EKKEHARD ET AL: "Dipeptidyl peptidase IV in the immune system.Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes" Seite 37; XP002114197 Zusammenfassung & BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, Bd. 372, Nr. 5, 1991, Seiten 305-311, ---	1-18
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER-UNIV. HALLE), 21. November 1991 (1991-11-21) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung ---	1-18
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 2, 13. Januar 1997 (1997-01-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 16161j, STOECKEL A. ET AL: "Competitive inhibition of proline specific enzymes by amino acid thioxopyrrolidides and thiazolidides" Seite 241; XP002114198 Zusammenfassung & PEPT: CHEM.,STRUCT.BIOL.,PROC.AM. PEPT.SYMP., Nr. 14, 1995, Seiten 709-710, ---	1-18
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 25, 21. Juni 1993 (1993-06-21) Columbus, Ohio, US; abstract no. 255342k, Seite 933; XP002114199 Zusammenfassung & JP 04 334357 A (FUJERE BIO INC) 20. November 1992 (1992-11-20) ---	1-18

	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>HEIHACHIRO ET AL: "Synthesis of prolyl endopeptidase inhibitors and evaluation of their structure-activity relationships : in vitro inhibition of prolyl endopeptidase"</p> <p>CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 41, Nr. 9, 1993, Seiten 1583-1588, XP002114196</p> <p>PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP</p> <p>ISSN: 0009-2363 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03712

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9740832	A	06-11-1997	DE	19616486 A	30-10-1997
			AU	3023397 A	19-11-1997
			CN	1216468 A	12-05-1999
			EP	0896538 A	17-02-1999
WO 9515309	A	08-06-1995	AU	1113395 A	19-06-1995
			AU	8421998 A	12-11-1998
			CA	2178066 A	08-06-1995
			CN	1141033 A	22-01-1997
			CZ	9601595 A	15-01-1997
			EP	0731789 A	18-09-1996
			FI	962315 A	05-08-1996
			HU	76274 A	28-07-1997
			JP	9509921 T	07-10-1997
			NO	962269 A	30-07-1996
			PL	314838 A	30-09-1996
			ZA	9409525 A	02-08-1995
DD 296075	A	21-11-1991	KEINE		
JP 4334357	A	20-11-1992	KEINE		